

A lipoamid-dehidrogenáz és az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz komplex molekuláris patológiája

Ambrus Attila



Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet

Biokémiai Tanszék

Semmelweis Egyetem

Budapest

2021

Bevezetés

A humán (dihidro)lipoamid-dehidrogenáz (hLADH, hE3) elégtelenség/deficiencia egy ritka és általában súlyos klinikai lefolyású – autoszómális recesszív öröklődésű – genetikai betegség. A hLADH az anyagcserében kiemelt szereppel bíró mitokondriális α -ketosav-dehidrogenáz (piruvát-dehidrogenáz (PDH), α -ketoglutarát-dehidrogenáz (KGDH), elágazó-szénláncú α -ketosav-dehidrogenáz (ELKDH) és α -ketoadipát-dehidrogenáz (KADH)) komplexek közös harmadik alegysége (hE3), illetve része a glicinhasító-rendszernek is. A fenti α -ketosav-dehidrogenáz komplexekben a hLADH szerepe az E2 alegységekhez kovalensen kötött dihidroliponsav (DHLS) kofaktor liponsavvá (LS) történő oxidálása. Az enzim alulműködése egyszerre érinti az összes fenti enzimkomplexet és így sokkal súlyosabb tünetekkel jár együtt mint az izolált enzimkomplex deficienciák. Elsősorban az intenzív metabolizmust folytató, nagy oxigénigényű szöveteket érinti a betegség és így a klinikai lefolyást is főleg a neurológiai, illetve kardiológiai tünetek dominálják, míg a máj funkciózavarai is meglehetősen gyakoriak. Jellemző klinikai fenotípusok: növekedés elmaradása, fejlődési rendellenességek, enkefalopátia, májelégtelenség, az izomzat tónustalansága, laktát-acidózis, hipertrófiás kardiomiopátia, hipoglikémia, Leigh-szindróma, látás-károsodás, mikrokefália, illetve ataxia. A klinikai tünetek sokszor már a neonatális korban megjelennek és gyakran korai halállal végződnek. Az akut rohamok között a betegek kezelése empirikus alapon folyik (étrendi megkötések, antioxidánsok, illetve vitaminok adása). Az érett enzimre vonatkozóan a klinikai szakirodalomban eddig 14 patogén aminosav-szubsztitúciót (vagy deléciót) írtak le. A tünetek súlyossága többnyire nem korrelál jól a klinikai mintákban mérhető LADH-aktivitás-csökkenés mértékével. Így joggal feltételezhető, hogy egyéb súlyosbító faktorok is hozzájárulhatnak a patomechanizmushoz.

A hKGDHk meglehetősen érzékeny oxidatív behatásokra, miközben a saját maga által termelt reaktív oxigénszármazékok (ROS [itt szuperoxid, illetve H_2O_2 , lásd alább]) a mitokondriális oxidatív stressz egyik legmeghatározóbb forrásai (a többi rokon komplex nem mutat ilyen számottevő mértékű ROS-képzést). A hKGDHk ROS-képző aktivitása akkor fokozódik, ha a fiziológias elektronakceptor, a NAD^+ nem áll megfelelő mennyiségben rendelkezésre (a *forward* reakcióban), vagy ha a NADH/NAD^+ -arány megemelkedik (ami pedig a ROS-termelő *reverz* E3 reakciót támogatja; a hLADH egy flavoenzim, amely egyelektronos reakciókban is képes részt venni, például az O_2 -nel is). Szignifikáns mértékben emelkedik a NADH/NAD^+ -arány például iszkémiában, fokozott kalóriabevitel esetén vagy Komplex I elégtelenségben.

Mivel a hE3 alegységen keresztül valósul meg mindkét katalitikus irányban a hKGDHk ROS-képzése, felvetődött, hogy vajon hogyan modulálják ezt az aktivitást a patogén hLADH mutációk. A hE3 alegységet tartalmazó α -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek elégtelen működése hLADH-deficienciában nem kizárólag a hLADH-aktivitás csökkenéséből eredhet. A hPDHk alulműködéséhez például nagy valószínűséggel hozzájárul az is, hogy bizonyos patogén hE3 mutánsok csökkent affinitással kötődnek a hPDHk-ben jelenlevő E3-kötő fehérjéhez (E3KF). Klinikai eredmények alapján azt is valószínűsíthetjük, hogy egyes betegséget-okozó aminosav-szubsztitúciók a hE3 hKGDH- és hELKDH-komplexekre vonatkoztatott affinitásait is befolyásolják. A hE3 egy nem-kovalens, funkcionális homodimer, amelyben a fiziológias aktivitáshoz a szomszédos monomer bizonyos aminosavai is szükségesek mindkét aktív centrumban. A patológias körülmények között megjelenő acidózis okozta diaforáz/ROS-képző-aktivitás növekedés, illetve a dimerizációs felszínt érintő mutációk hátterében is a hE3 monomerizációját

feltételezték. Egy hLADH monomer egy FAD prosztetikus csoportot köt, erős, de nem-kovalens módon. A FAD kötésében – a hLADH kristályszerkezete alapján – monomerenként legalább 36 aminosav oldallánc játszik szerepet. Potenciálisan szintén része lehet bizonyos esetekben a pathomechanizmusnak a FAD részleges elvesztése is, amelyre vonatkozóan voltak már korábbi irodalmi adatok (a betegséget-okozó mutációk potenciálisan távolható szerkezeti változások által is képesek lehetnek befolyásolni például a FAD kötését is).

Amint fentebb is látható, számos megválaszolatlan kérdés volt/van az irodalomban különösen a LADH-elégtelenség molekuláris patomechanizmusa tekintetében. Kutatásaink során a patomechanizmus kérdéses elemeit céloztuk meg, különös tekintettel a ROS-képzés esetleges szerepére. Fő célunk volt a klinikumban leírt hLADH variánsok nagyfelbontású szerkezeteinek a meghatározása, amelytől azt vártuk, hogy atomi szinten magyarázza majd meg a mutánsok patológiás viselkedését. Munkahipotézisünk szerint pedig, a biokémiai, biofizikai és szerkezeti információk birtokában potenciálisan képesek lehetünk akár farmakológiailag is megcélozni a jövőben a komplex patomechanizmusok egyes elemeit. Ez bizonyos esetekben talán javíthatná ennek az igen súlyos genetikai betegségnek a klinikai lefolyását. A hKGDHk tekintetében pedig célunk volt a komplex-általi ROS-képzés részletes karakterizálása és gátolhatóságának vizsgálata. Ezen felül a komplex szerkezetvizsgálatát is célul tűztük ki farmakológiai regulációs stratégiák jövőbeni szerkezetalapú tervezéséhez.

Célkitűzések

1. Rekombináns, tiszta állapotú és funkcionálisan aktív hE1k, hE2k és hE3 alegységek/komponensek előállítása.
2. A hLADH és a hKGDHk ROS-képző aktivitásának részletes vizsgálata. Izolált illetve rekombináns enzimek vizsgálata. A hE1k komponens és a h(E1k-E2k) alkomplesz vizsgálata. Összehasonlítás más rokon komplexekkel.
3. A hLADH 14 patogén variánsának előállítása rekombináns módon, tiszta (homogén) formában. A variánsok részletes biokémiai, biofizikai és szerkezeti jellemzése, különös tekintettel a ROS-képző képességre. Javaslattétel a vonatkozó molekuláris patomechanizmusokra.
4. A hE1k és hE2k komponensek szerkezeti jellemzése. A hKGDHk szerkezeti topológiájának meghatározása.
5. Gyógyszerjelölt molekulák tervezése a hLADH-elégtelenség, illetve a hKGDHk/hLADH ROS-képzése tekintetében.

Alkalmazott módszerek

A hLADH és betegség-okozó variánsai előállítására beállítottunk egy periplazmatikus és egy citoszólikus *E. coli* expressziós rendszert is. A periplazmatikus rendszer elméletileg funkcionálisan jobb minőségű fehérjét szolgáltat, míg a citoszólikus rendszer lényegesen nagyobb mennyiségben termeli a fehérjét, amely pedig szerkezetvizsgálati céljaink miatt vált mindenképpen szükségessé (NMR, kristályosítási próbák). A fehérje-variánsokat a laboratóriumban hoztuk létre standard protokollt követve (QuikChange II kit, Agilent). A vonatkozó expressziós vektorok egy affinitás címkét (N-terminális Strep-tag) is tartalmaztak, mely segítségével egy lépésben is képesek voltunk megtisztítani a fehérjetermékeinket FPLC kromatográfiát alkalmazva. Az optimalizált tisztítási módszerünkkel kristályosításhoz is megfelelő homogenitást tudtunk elérni. Egy refolding eljárást is kifejlesztettünk az inklúziós testekbe jutott fehérje visszanyerésére. A *forward* illetve *reverz* LADH reakciót NADH keletkezésén illetve fogyásán keresztül mértük spektrofotometriásan (340 nm). A KGDHk, illetve PDHk *forward* katalitikus irányú, teljes reakciókat szintén NADH keletkezésén keresztül mértük. Szuperoxid-termelést részlegesen acetilált cit c (spektrofotometriás módszer, 550 nm) vagy dihidroetídium (fluorimetriás módszer, 470/600 nm [gerjesztés/emisszió]) alkalmazásával detektáltunk. A cit c esszé meglehetősen kis érzékenységgű, ezért azt legtöbbször csak pH=6,3-on alkalmaztuk, mivel ezen a pH-n a vizsgált enzimjeink – pH=7,3-hoz képest többszörösen – emelkedett ROS-képzést mutatnak. H₂O₂-t torma-peroxidáz (*horseradish peroxidase*, HRP) jelenlétében Amplex-Red alkalmazásával detektáltunk (fluoreszcens rezorufin keletkezik, 550/585 nm [gerjesztés/emisszió]). A ROS-képzés során – az általunk vizsgált enzimek esetében – az elsődleges termék a szuperoxid, a H₂O₂ a szuperoxidból részleges, spontán

diszmutációval/diszproporcionálódással keletkezik. A LADH enzim mind a *forward* mind pedig a *reverz* irányú reakcióban képes ROS-t termelni. A szakirodalom viszont metodikai okokból – a DHLS pro-oxidáns volta miatt, amit a ROS-detektáló rendszerekben kifejt, továbbá korábbi nehéz beszerzése avagy szintézise miatt is – szinte kizárólag a *reverz* reakciót alkalmazza, így ezt a módszert követtük mi is. A KGDH illetve PDH komplexek esetén mindkét irányú reakcióban képesek voltunk ROS-termelést detektálni a fenti módszerekkel. Kalibrált gélszűrés kromatográfiával kapcsolt nanoLC-MS technikát alkalmaztunk a hLADH és patogén variánsai monomerizációjának vizsgálatára. Távoli-UV cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiát használtunk a patogén hLADH variánsok globális szerkezeti változásainak detektálására. A patogén hLADH mutánsok esetében a - nem kovalens módon kötött - FAD prosztetikus csoport (részleges) elvesztését úgy vizsgáltuk, hogy hőkezeléssel denaturáltuk a fehérjét, majd kalibrált módon mértük a felszabadult FAD mennyiségét 455 nm-en. Minthogy az NMR technika, illetve kezdetben a kristályosítás alkalmazása sem volt célravezető a patogén hLADH variánsok szerkezetvizsgálata tekintetében, molekuláris dinamika (MD) szimulációkat hajtottunk végre (X-PLOR-NIH program, szuperszámítógépes kapacitás) az összes (14) patogén hLADH variánsra vonatkozóan. Ezen eredményeket csak nagyon röviden említi ez a disszertáció, mindössze összehasonlításban a későbbi experimentális szerkezeti adatokkal. Szintén a szerkezeti információkhoz próbáltunk közelebb kerülni – akkor még kristályszerkezeti adatok hiányában – a hidrogén-deutérium-csere (HDX-) MS technika alkalmazásával, mellyel a 10 legjobban expresszálandó patogén hLADH variánst tudtuk megvizsgálni. A módszer oldatfázisban, nem-kriogén hőmérsékleten, illetve peptid-szinten mutatta meg a mutációk hatására bekövetkező fehérjesszerkezeti/dinamikai változásokat. Sokéves munka

gyümölcse volt, hogy sikeres kristályosítást tudtunk végrehajtani – a berlini szinkrotron munkatársainak segítségével – számos betegség-okozó hLADH variáns esetében, amelyből eddig hét nagyfelbontású szerkezetünk született. A kristályosítást minden esetben ülőcsepp technikával végeztük, illetve a kristályosítási körülményeket részletesen optimalizáltuk. A Helmholtz-Zentrum Berlin BESSY II röntgen-szinkrotronjában végeztük a diffrakciós méréseinket. A szerkezetszámításokat – a molekuláris helyettesítés technikáját alkalmazva – és az eredmények analizését magunk végeztük (némi kollaborációban a berlini kollégákkal). Krio-EM méréseinket a brno-i Krio-EM centrumban végeztük, kollaborációban az ottani kollégákkal. Ezen technikával a hKGDHk-E2 komponens szerkezetét vizsgáltuk. Kémiai keresztkötéssel kapcsolt MS (CL-MS) és molekulamodellezés technikákat is felhasználtunk a hKGDHk-E2 komponens teljes szerkezetének megoldása céljából, mivel bizonyos flexibilis régiók nem voltak láthatóak a krio-EM technika számára. Az experimentális adatok hibaszámításánál általában a középérték standard hibájával (standard error of the mean, S.E.M.) számoltunk, míg a statisztikai szignifikancia megállapításához mindig kétmintás t-próbát végeztünk (eltérő varianciát feltételezve, legalább $p \leq 0,05$ szignifikancia szint mellett).

Eredmények

Sikerült megfelelő minőségben és mennyiségben előállítanunk mindhárom hKGDHk komponenst, habár a hE1 komponens expresszióján szeretnénk még tovább javítani. Létrehoztuk és megtisztítottuk mind a 14 betegséget-okozó hLADH variánst is. A patogén hLADH mutánsok LADH-aktivitásai különböző mértékben csökkentek a vadtypushoz képest, mind a fiziológiás (*forward*), mind pedig *reverz* irányú reakcióban. Kivételt képezett a G194C-hLADH variáns, amelynek gyakorlatilag nem változott az aktivitása, míg a K37E-hLADH variáns fokozott *reverz* katalitikus irányú aktivitást mutatott, csökkent *forward* katalitikus irányú aktivitás mellett. Bizonyos hLADH-variánsok ROS-termelő kapacitása – és annak pH-szenzitivitása is – fokozódott a hLADH-hoz képest (P453L-, E340K-, D444V- és G194C-hLADH). A fenti G194C-, E340K- és D444V-hLADH mutánsokról, illetve az R447G- és R460G-hLADH variánsokról élesztő modellben kimutatták továbbá, hogy a KGDHk és PDHk enzimkomplexekben az E2-kötött liponsav-kofaktor oxidatív károsodását okozzák (ugyanazt a hatást figyelték meg D444V-homozigóta betegből származó fibroblasztokban is). A ROS-képző aktivitás emelkedése mellett a megfelelő mutánsok LADH-aktivitásai a kontrollhoz képest általában csökkentek (lásd fent). Érdekes megemlíteni, hogy a G194C-hLADH variánsban a hLADH-aktivitás gyakorlatilag nem változott (ahogy azt említettük fent is), míg ezzel szemben a P453L-hLADH variáns fiziológiás aktivitása gyakorlatilag teljesen elveszett. A P453L aminosavcsere igen súlyos klinikai következményekkel jár, amihez feltehetően az erősen emelkedett ROS-termelés is hozzájárul. A G194C aminosavcsere esetén a klinikai tünetek inkább csak felnőttkorban jelentkeznek, ami összhangban van a megtartott hLADH-aktivitás mellett fokozódó ROS-termelő kapacitással (az intenzívebb ROS-képzés okozta oxidatív eredetű

károsodások az idővel valószínűleg akkumulálódnak). Fontos megjegyezni, hogy a patogén mutációk fehérjén belüli pozíciója nem volt direkt összefüggésben a ROS-termelő képességgel. Ezen, illetve más adatok alapján a hLADH-elégtelenség patomechanizmusa magában foglalhatja bizonyos esetekben a fokozott ROS-képzést (különösen acidózisban, ami hLADH-elégtelenségben eléggé gyakori), a patogén hLADH-variánsokat tartalmazó enzimkomplexek fokozott disszociációját és – a hKGDHk szempontjából – az esetleges disszociáció után visszamaradó h(E1k-E2k) alkomplex intenzív ROS termelését (amit rekombináns alegységek felhasználásával szintén sikerült kimutatnunk).

In vitro összeépített komplex esetében, a kis mértékű acidózis támogatta a fiziológiás KGDHk-reakciót. Emellett azonban savas közegben a LADH *reverz* katalitikus irányú ROS-képzése is fokozódott. A természetes forrásból (sertés szív) nyert KGDHk-általi ROS-képzés intenzitása szintén megnőtt acidózisban, azonban csak a *reverz* katalitikus irányban. Kimutattuk, hogy a *reverz* katalitikus irányú ROS-képzést mind a KGDHk, mind pedig a LADH esetében az exogén liponsav gátolja, azonban csak acidózisban ($\text{pH} < 6,8$). Ebből arra is következtetünk egyébként, hogy acidózisban talán még fokozottabb lehet a LADH disszociációja a KGDHk-ról (a LADH eleve sokkal gyengébben koordinálódik a KGDHk-hoz, mint például a PDHk-hoz). A KGDHk *forward* katalitikus irányú ROS-képzését is gátolta a liponsav, habár itt eltérő mechanizmussal, az E2 alegységen hatott. Ha a komplex-kötött hLADH mennyisége nem optimális (például hLADH-deficiencia vagy acidózis esetén), a hKGDHk h(E1k-E2k) alkomplexe valóban bemutathatja – akár az adott hLADH variáns fokozott ROS-termelésével (a *reverz* katalitikus irányban) párhuzamosan – a korábban kimutatott szignifikáns *forward* katalitikus irányú ROS-termelését (elegendő alfa-ketoglutarát jelenlétében), amely tehát a vonatkozó

patomechanizmushoz szintén hozzájárulhat (lásd fent). Három másik hasonló módon létrehozott alkomplesz (*E. coli* PDHk, *E. coli* KGDHk, hPDHk E1-E2 alkompleszek) nem mutatott szignifikáns mértékű ROS-képzést, míg a teljes komplexek esetén jelentékeny intenzitású ROS-termelést tapasztaltunk (*in vitro*). A h(E1k-E2k) esetén, a DHLS kofaktor pro-oxidáns tulajdonsága feltételezhető a fokozott ROS-képző képesség hátterében. Kimutattuk, hogy *in vitro* a hKGDHk hE1k alegysége is képes szignifikáns mértékű ROS-képzésre, szintén eltérően a másik három vizsgált rokon E1 alegységtől. Ez az aktivitás például E2-deficienciában patológiás jelentőséggel bírhat. Javaslatot tettünk – rekombináns alegységeket felhasználva – az irodalomban kérdéses multienzim-komplex alegység-sztöchiometriák szempontjából is. A hKGDHk tekintetében a 24:24:12 alegység-sztöchiometriát javasoltuk, amely a tudományterület egyik vitatott kérdése volt.

HDX-MS eredményeink és a hE3-E3KF-komplex kristályszerkezete alapján, csökkent E3KF-iránti affinitás feltételezhető az irodalomban megadott variánsok (R447G-, E340K-, K37E-, D444V-, R460G-, P453L-hLADH) mellett további három mutáns esetében is (I318T-, I445M-, I358T-hLADH). A megfelelő közleményben egyéb fontos megállapításokat is tettünk a HDX-MS mérések alapján az egyes variánsok kofaktor-kötése, aktív-hely geometriája és egyéb szerkezeti tulajdonságai szempontjából. Ezen megfigyelések egy része korrelációban volt az általunk szintén elvégzett MD szimulációk eredményeivel.

1D ^1H és DOSY-NMR spektroszkópia, ultracentrifugálás (mások által), HDX-MS, kalibrált gélszűrés, nanoLC MS, MD szimuláció és újabban kristályszerkezeti adat is bizonyította, hogy sem a patológiásan releváns savasodás, sem pedig az eddig vizsgált patogén dimerizációs felszint érintő mutációk nem vezetnek a hLADH (dimer) disszociációjához. Az eddig vizsgált hLADH-variánsok FAD-tartalma (mol FAD/1 mol

hLADH monomer egységben kifejezve): G194C-hLADH (0,72), P453L-hLADH (0,66), E340K-hLADH (0,99), K37E-hLADH (0,76, illetve 0,67), D444V-hLADH (0,95). A HDX-MS analízis azt mutatta, hogy az egyes szubsztitúciók fehérjeszerkezetre gyakorolt hatásai a FAD-kötésben szerepet játszó aminosavak változó számát érintették, mindazonáltal - a fehérjeszerkezet szintjén - minden esetben tudtuk a FAD-vesztés potenciális okait (kvalitativ) értelmezni. A hLADH és számos patogén mutánsa CD spektrumjait összehasonlítva nem találtunk szignifikáns eltéréseket egyik vizsgált variáns esetében sem. Ez a globális konformáció nagymértékű megőrzöttségére utal és a fenti eredményeket is tekintetbe véve kifejezi, hogy a mutáns fehérjék finomszerkezetében szükséges tovább keresnünk a funkcióváltozások hátterében álló szerkezeti eltéréseket.

Magától értetődő módon, akkor kaptuk a legtöbb és legbiztosabb szerkezeti információkat, amikor sikerült hét betegséget-okozó variáns nagyfelbontású kristályszerkezeteit meghatározni. Legfontosabb eredményeink ezzel kapcsolatban a következők voltak: A P453L szubsztitúció számottevő mértékű szerkezeti változásokat indukált az aktív-helyben. Ezek a szerkezeti eltérések valamilyen szinten valószínűleg gátolják a (DH)LS-szubsztrát megfelelő kötődését és/vagy – katalitikus bázis általi – (de)protonálódását. A P453L-hLADH jelentősen fokozott ROS-képzése a FAD környezetében – a szuperoxid-képzés helye közelében – bekövetkező szerkezeti perturbációkkal, illetve egyes FAD-ot stabilizáló – és annak redox-potenciálját esetlegesen moduláló – kölcsönhatásoknak a megszűnésével indokolható. A G194C-hLADH esetében mindössze kismértékű szerkezeti perturbációkat találtunk a közeli kofaktor-kötő aminosavak érintettsége nélkül. Ez az eredmény jó összhangban van a megtartott katalitikus aktivitással. A G426E-hLADH esetén csupán kisebb –elsősorban a lokális töltéseloszlást, illetve az

oldallánci dinamikát moduláló – szerkezeti perturbációkat találtunk, szintén a kofaktor-kötőhelyhez közel. Ebben az esetben még tovább kell vizsgálnunk a molekuláris patomechanizmust. A dimerizációs felszint érintő patogén szubsztitúciók egy csoportjánál (D444V, R447G, I445M, R460G) jelentős aktivitás-csökkenés volt megfigyelhető általánosságban, amelynek hátterében – a kristályszerkezetek alapján – az aktív-helyhez vezető ún. H^+/H_2O -csatornában létrejövő szerkezeti változások állhatnak.

A hLADH szerkezetét, illetve a katalizált reakciót érintő új megfigyeléseink a következők voltak: A hLADH szerkezete alapján a Glu332 és az Arg460' (' a másik monomerre utal) aminosavak – alternatív konformációk felvétele által – modulálják a H^+/H_2O -csatorna felszíni polaritását, illetve szélességét. A fenti két aminosav az R460G-, D444V- és I445M-hLADH variánsokban nem mutatta a hLADH-ban megfigyelt konformációs flexibilitást. A Glu332 és az Arg460 szerepét részletesen kívánjuk vizsgálni a jövőben.

Keresztkötéses MS-sel (CL-MS) és (molekula)modellezéssel kombinált krio-EM vizsgálattal sikerült meghatározni a hKGDHk hE2k komponensének szerkezetét (2,9 Å felbontással). A vizsgálat egy 8x3-as szimmetriájú (kocka-alakú) szerkezetet eredményezett. Ezt a szerkezetet alaposan analizáltuk elsősorban a trimerek és a 24-mer kialakulásának szerkezeti feltételei, illetve a szubsztrát-interakciók szempontjából. Korábbi – *in vitro* összeépített hKGDHk-val (kollaborációban) gyűjtött – HDX- és CL-MS adatainkat is felhasználva, a hKGDHk szerkezeti topológiájára szintén javaslatot tettünk.

A disszertációhoz kapcsolódó új tudományos eredmények összefoglalása

1. Az exogén liponsav acidózisban gátolja a KGDHk és a LADH *reverz* katalitikus irányú ROS képzését. Ez a megfigyelés specifikus ROS-képzés inhibitorok jövőbeli fejlesztésének lehet majd az alapja.
2. Mind a 14 betegséget- okozó hLADH variánst előállítottuk rekombináns módon nagytisztaságú formában, illetve mindet jellemeztük is *forward* és *reverz* katalitikus irányú enzimaktivitás és *reverz* katalitikus irányú ROS-képző kapacitás szempontjából. Számos variánst további biofizikai és biokémiai módszerekkel is megvizsgáltunk. Legfontosabb megfigyelésünk, hogy a hLADH négy betegséget- okozó mutációja szignifikánsan fokozta a *reverz* katalitikus irányú ROS-képzést és annak pH-érzékenységét. Ez a jelenség részét képezheti a vonatkozó molekuláris patomechanizmusoknak, illetve a többnyire igen súlyos klinikai tüneteknek.
3. A *forward* katalitikus irányú ROS-termelő képesség tekintetében a hKGDHk E1 komponense, illetve E1-E2 alkomplexe összemérhető a teljes hKGDHk-el. Ezen jelenségeknek E2- illetve E3-elégtelenségben patológiás relevanciája lehet. Azon patogén hLADH mutánsok esetében, ahol csökken a mutáns kötődési affinitása a multienzim komplexekhez, a hKGDHk-E1-E2 alkomplex általi *forward* katalitikus irányú ROS-képzés szignifikánsan hozzájárulhat a vonatkozó molekuláris patomechanizmusokhoz és a klinikai tünetekhez.
4. Krio-EM, CL-MS és molekulamodellzés technikák együttes alkalmazásával meghatároztuk a hKGDHk E2 komponensének szerkezetét. A hKGDHk ezen komponensére vonatkozóan

eddig egyáltalán nem volt szerkezeti információ az irodalomban. Utóbbiból kifolyólag, a szerkezetet igen részletesen jellemeztük is.

5. Meghatároztuk a hKGDHk alegység-sztöchiometriáját, amely 24:24:12-nek adódott. Ezt az eredményt, valamint a fenti (krio-EM, CL-MS és molekulamodellezési) és kollaborációban mért HDX-MS szerkezeti adatokat is felhasználva – először az irodalomban – javaslatot tettünk a teljes multienzim komplex szerkezeti topológiájára. Tekintve, hogy a hKGDHk egy citrát-köri enzim, illetve az egyik legfontosabb – ha nem a legfontosabb – eleme a mitokondriális ROS-képzésnek, az eredmény (a 4. ponttal együtt) kiemelt jelentőséggel bír, többek között potenciális jövőbeli farmakológias reguláció tekintetében is.

6. Tíz betegséget-okozó hLADH variánsra vonatkozóan meghatároztuk a peptid-szintű molekulaszerkezeti/dinamikai változásokat oldatban, 25 °C-on, HDX-MS technikával és javaslatot tettünk a vonatkozó molekuláris patomechanizmusokra. Ezen experimentális adatok jól kiegészítik a későbbi krisztallográfiai adatokat, amelyek esetén – a kriogén vizsgálati hőmérséklet, illetve a kristálypakolódás miatt – bizonyos szerkezeti mozgások és eltérések potenciálisan másként is modulálódhattak, mint fiziológiásan releváns(abb) körülmények között.

7. Hét betegséget-okozó hLADH variánsnak meghatároztuk a nagyfelbontású kristályszerkezetét, illetve – a fenti HDX-MS adatokat is figyelembe véve – a vonatkozó molekuláris patomechanizmusokra is javaslatot tettünk. Meghatároztuk a hLADH eddigi legnagyobb felbontású kristályszerkezetét is. A hLADH katalitikus mechanizmusa, illetve bizonyos betegséget-okozó hLADH variánsok molekuláris

patomechanizmusai tekintetében fényt derítettünk egy ezidáig kevésbé vizsgált ún. H^+/H_2O -csatorna szerepére. A szerkezeti adatok megteremtik az esetleges jövőbeli farmakológias reguláció alapját.

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények listája

1. Ambrus A[#], Tretter L[#], Adam-Vizi V, Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase-mediated reactive oxygen species generation by lipoic acid, *J. Neurochem.* 109(S1): 222-229 (2009) ([#]=megosztott első szerzők)
2. Ambrus A, Torocsik B, Tretter L, Ozohanics O, Adam-Vizi V, Stimulation of reactive oxygen species generation by disease-causing mutations of lipoamide dehydrogenase, *Hum. Mol. Genet.* 20(15): 2984-2995 (2011)
3. Ambrus A, Nemeria NS, Torocsik B, Tretter L, Nilsson M, Jordan F, Adam-Vizi V, Formation of reactive oxygen species by human and bacterial pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complexes reconstituted from recombinant components, *Free Radic. Biol. Med.* 89: 642-650 (2015)
4. Ambrus A[#], Wang J[#], Mizsei R[#], Zambo Z, Torocsik B, Jordan F, Adam-Vizi V, Structural alterations induced by ten disease-causing mutations of human dihydrolipoamide dehydrogenase analyzed by hydrogen/deuterium-exchange mass spectrometry: Implications for the structural basis of E3 deficiency, *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* 1862: 2098-2109 (2016) ([#]=megosztott első szerzők)
5. Szabo E, Mizsei R, Wilk P, Zambo Z, Torocsik B, Weiss MS, Adam-Vizi V, Ambrus A, Crystal structures of the disease-causing D444V mutant and the relevant wild type human dihydrolipoamide dehydrogenase, *Free Radic. Biol. Med.* 124: 214-220 (2018)
6. Szabo E, Wilk P, Nagy B, Zambo Z, Bui D, Weichsel A, Arjunan P, Torocsik B, Hubert A, Furey W, Montfort WR,

Jordan F, Weiss MS, Adam-Vizi V, Ambrus A, Underlying molecular alterations in human dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency revealed by structural analyses of disease-causing enzyme variants, *Hum. Mol. Genet.* 28(20): 3339-3354 (2019)

7. Nagy B, Polak M, Ozohanics O, Zambo Z, Szabo E, Hubert A, Jordan F, Novaček J, Adam-Vizi V, Ambrus A, Structure of the dihydrolipoamide succinyltransferase (E2) component of the human alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex (hKGDHc) revealed by cryo-EM and cross-linking mass spectrometry: Implications for the overall hKGDHc structure, *BBA – Gen. Subj.* doi: 10.1016/j.bbagen.2021.129889 (2021)